AUS DEM PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT TÜBINGEN
(Vorstand: Prof. Dr. F. Haffner)

Zur Löslichkeit des Knochenkalks

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin,
Chirurgie und Geburtshilfe
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hans Bauer

aus Hard (Vorarlberg)

1937

Buchdruckerei Bölzle, Tübingen, Marktgasse 10

Dekan: Professor Dr. Usadel

Berichterstatter: Prof. Dr. Haffner

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät
der Universität Tübingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Einleitung.

Bei der Diskussion über die noch in keiner Weise geklärten Verkalkungs- und Entkalkungsvorgänge am Knochen steht im Mittelpunkt die Frage der Löslichkeitsverhältnisse der Knochensalze, sowohl bei den Autoren, die wie Pfaundler [1]), Freundlich und György [2]) eine Zwischenreaktion der anorganischen Jonen mit organischen Bestandteilen annehmen, wie auch bei denjenigen, die eine einfache Ausfällung der Knochensalze aus dem Blutwasser an den Anfang der Verkalkung setzen wie z. B. Shear und Kramer [3]).

Bis vor kurzem ging die allgemeine Anschauung dahin, daß die Mineralbestandteile des Knochens dem natürlich vorkommenden Karbonat-Apatit entsprächen. Hoppe—Seyler [4]) hat zum ersten Mal darauf aufmerksam gemacht, daß Calcium und Phosphorsäure im Knochen im selben Verhältnis wie im Apatit (10 Ca: 6 PO_4) vorkommen. A. Werner [5]) hat auf Grund des Verhältnisses $Ca : PO_4 : CO_3 = 1 : 0{,}6 : 0{,}1$ für das Knochenmineral folgende Formel angenommen:

$$[Ca\ (Ca_3\ (Po_4)_2)_3]\ CO_3$$

Shear und Kramer gelangten nun zu der Auffassung, daß die Gegenwart eines Kalkphosphates von der Zusammensetzung $Ca_3\ (PO_4)_2$ unbewiesen sei, daß vielmehr, wenigstens in den ersten Verkalkungsherden das Auftreten von $CaHPO_4 + Ca\ (OH)_2$ anzunehmen sei. Unabhängig davon haben Klement [6]) und später Klement und Trömel [7]) auf Grund eingehender Arbeiten die Meinung ausgesprochen, daß die anorganische Knochensubstanz in der Hauptsache aus Hydroxyl-Apatit ($Ca_{10}\ (PO_4)_6\ (OH)_2$) bestehe. Sie schlossen das einmal daraus, daß in wässrigen Lösungen von Calciumphosphaten nicht wie man bisher angenommen hat das tertiäre Calciumphosphat sondern der Hydroxyl-Apatit die allein beständige Calciumphosphatverbindung darstellt, zum andern daraus, daß bei Ausschüttelung anorganischer Knochensubstanz mit Leitfähigkeitswasser neben Natrium, Kalium und Magnesium auch der größere Teil der Kohlensäure, dagegen nur eine viel kleinere Menge Phosphorsäure in Lösung geht. Das Carbonat sehen sie daher, wenigstens in seiner Hauptmasse, als einen nebensächlichen adsorptiv gebundenen Bestandteil des Knochens an. Ein Carbonat-Apatit könne nicht die anorganische Substanz des Knochens sein,

da Calcium, Phosphat und Carbonat sonst im gleichen Verhältnis wie sie im Knochen vorliegen herausgelöst werden müßten. Die Schlüssigkeit dieser letzteren Beweisführung dürfte anfechtbar sein; nach den heutigen Vorstellungen der Mineralogie können die das Kristallgitter zusammensetzenden Jonen nicht als eine untrennbar geschlossene Verbindung angesehen werden; es ist vielmehr ein Austritt (bzw. ein Ersatz) einzelner Jonen aus dem Gitterverband möglich, ohne daß etwa eine Auflösung des Kristalls im Verhältnis seiner Jonenbestandteile stattfinden mußte.

Unter den weiteren physikalisch-chemischen Problemen der Knochenmineralisation hat von Anfang an die Frage des Einflusses der Reaktion die Autoren beschäftigt. Daß unter den Bedingungen des lebenden Organismus beim Auf- und Abbau des Knochenminerals Reaktionsverhältnisse eine Rolle spielen können, scheint nirgends bestritten zu werden. Die Reaktionsfrage steht naturgemäß im engsten Zusammenhang mit der Frage der Zusammensetzung des Knochenminerals, ist aber unabhängig von der speziellen Frage ob das Carbonat als Apatitverbindung oder nur in adsorptiver Bindung vorliegt. Fast alle Autoren die sich experimentell mit der Knochenmineralisation befaßt haben, haben auch die Reaktionsfrage mitberücksichtigt. Speziell darauf angesetzte Versuche wie das Verhältnis von Phosphorsäure und Carbonat durch etwaige Reaktionsänderungen verschoben wird, haben wir jedoch nicht finden können. Im folgenden wurde daher der Versuch gemacht, diesen Punkt experimentell zu klären.

Arbeitsweise

Allgemeines:

Zur Untersuchung der Niederschlagsbildung wurden Lösungen verschiedener Zusammensetzung angesetzt und der sich bei Zimmertemperatur bildende Niederschlag quantitativ analysiert. Zur Frage der Auflösungsverhältnisse wurden zuerst Vorversuche über die Löslichkeit von Kalksalzen und Knochenmehl gemacht. In den Hauptversuchen wurde frischgewonnener Kalbsknochen (Diaphyse von Röhrenknochen) ungetrocknet mit einer Raspel zerkleinert und in Lösungen verschiedener P_h gebracht. In verschiedenen Zeitabständen wurden Proben dieser Lösungen auf ihren Gehalt an P und Ca geprüft.

Besonderes:

1. Die verschiedenen Reaktionsgrade wurden durch Zusammengeben verschiedener Puffergemische auf Grund einer Berechnung der P_h hergestellt. Die genauen P_h wurden dann colorimetisch oder elektrometrisch bestimmt.

2. Die Bestimmung des Ca wurde nach der Mikromethode von De Waard (Biochem. Zeitschrift 1918 S. 186) ausgeführt. Wir gingen dabei gemäß seinen Vorschriften vor. Ein ausgezogenes Zentrifugenröhrchen wurde mit 1 ccm der zu bestimmenden Lösung beschickt und 1 ccm gesättigte Ammoniumoxalat-Lösung zugegeben. Nach 15 Minuten wurde 5 Minuten lang zentrifugiert und der Niederschlag dreimal mit je 2 ccm aqua destillata gewaschen; die Waschflüssigkeit darf sich nach dem letzten Waschen mit Calciumsalzlösung nicht mehr trüben. Dann wurde der Niederschlag in 1 ccm n/1 $H_2 SO_4$ gelöst, im Wasserbad erwärmt und mit n/100 Permanganatlösung titriert. 1 ccm der verwendeten Permanganatlösung entsprechen 0,2 mg Ca. Die Bestimmung geschah stets in Doppelversuchen. Wenn zwischen beiden Proben ein erheblicher Unterschied bestand, wurde eine dritte und vierte Probe angesetzt.

3. Zur Bestimmung des P diente uns die Phosphorsäuretitration nach K. Samson (D. M. Wochenschrift 1925 S. 1571).

In ein ausgezogenes Zentrifugengläschen wird 1 ccm der zu bestimmenden Lösung pipettiert und unter jeweils gutem Durchschütteln

1 ccm 30%ige Ammoniumnitratlösung
0,4 ccm konz. HNO_3
1 ccm 3%ige Ammoniummolybdatlösung

zugegeben. Das Gläschen kam für 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad, bis ein grüngelber Niederschlag auftrat und wurde dann auf Zimmertemperatur abgekühlt. Unter leichtem Umschütteln wurden 1 ccm 96%iger Alkohol zugegeben und der Niederschlag abzentrifugiert (10 Minuten). Der Niederschlag wurde 3—5 mal mit je 3—4 ccm 1%iger Kaliumnitratlösung gewaschen und der Waschflüssigkeit $^1/_2$ ccm Alkohol (96 %) unter leichtem Schütteln zugesetzt; $^1/_2$ ccm Alkohol wurde übergeschichtet, um das Haften des Niederschlags an der Wand zu verhüten. Nach dem Waschen wurde geprüft, ob die Waschflüssigkeit säurefrei war; blaues Lackmuspapier darf nicht mehr gerötet werden. Der Niederschlag wurde in n/25 Na OH im heißen Wasserbad gelöst; je nach Größe des Niederschlags wurde eine abgemessene Menge Na OH zupipettiert, gewöhnlich reichten 3—6 ccm aus. Nach Zusatz von einem Tropfen Phenolphthalein-

lösung wurde unter gutem Umschütteln mit n/25 HCl bis zur Entfärbung des Phenolphthaleins titriert. Die Differenz zwischen der zur Lösung verbrauchten NaOH und der zur Rücktitration verwendeten HCl ergibt mit 0,0478 multipliziert den P in mg.

4. Zur CO_2-Bestimmung im Niederschlag wurden 6 Gasdurchleitungsflaschen hintereinander an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. In die ersten zwei Flaschen kamen je 50 ccm 20%ige NaOH, um die Luftkohlensäure der durchgeleiteten Luft zu binden; in die dritte Flasche 20 ccm H_2O, in die vierte der zu untersuchende Niederschlag. Auf dieser Flasche war eine Bürette aufgesetzt, aus der Säure zupipettiert wurde, um die Kohlensäure auszutreiben. In den nachfolgenden 2—3 Flaschen war die Vorlage verteilt, die die Kohlensäure binden sollte. Es wurde Ba (OH_2) verwendet, die mittels n/10 HCl zurücktitriert wurde. Bei der Titration diente Phenolphthalein als Indicator. Als austreibende Säure wurde n/1 HCl benutzt.

Ehe die Versuche so durchgeführt werden konnten, daß sie zu entscheidenden Ergebnissen führten, war eine Reihe von Versuchen notwendig, um einerseits die zweckmäßigste Arbeitsweise für die Verarbeitung des Versuchsmaterials festzustellen, andererseits die Konzentrationsverhältnisse aufzufinden, in denen von Reaktionsveränderungen abhängige Ausschläge eintraten.

Versuche

Wir bringen im Folgenden nur die entscheidenden Ergebnisse, deren Ausfall durch Kontrollversuche erhärtet ist.

I. Der Einfluß der Ph auf das Auflösungsverhältnis von Ca und P.

1. Ansatz
   1. 0,2 g Knochen +
   2. 20 ccm Milchsäure, mit n/Na OH auf verschiedene Ph abgepuffert.

Tabelle 1.

P_h	A Ca	B Ca
2,0	0,048 g	0,0672 g
3,0	0,0392 g	0,0387 g
4,0	0,0340 g	0,0336 g
4,5	0,0320 g	0,0248 g

Die angegebenen Ca-Mengen beziehen sich auf den gesamten Ansatz (20 ccm) und entsprechen den in Lösung gegangenen Calciummengen.
A gibt die Werte nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur.
B gibt die Werte nach 2 Stunden Aufenthalt im kochenden Wasserbad.

2. Ansatz
1. 0,2 g Knochen + 20 ccm $^1/_3$ mol. prim. Phosphat
2. 0,2 g Knochen + 20 ccm sek. : prim. Phosphat 1:16
3. 0,2 g Knochen + 20 ccm sek. : prim. Phosphat 1:4
4. 0,2 g Knochen + 20 ccm sek. : prim. Phosphat 1:1

Es wurde das in Lösung gegangene Ca, nach 25 Stunden, nach 50 Stunden bei Zimmertemperatur und dann nach 2 Stunden im kochenden Wasserbad, bestimmt.

Tabelle 2.

	P_h	nach 24 Std. Ca g in 20 ccm	nach 50 Std. Ca g in 20 ccm	n. 2 Std. W. Bad Ca g in 20 ccm
Ansatz 1	5.0	0,0024	0,002	0,00368
Ansatz 2	5,5—6,0	0,00152	0,0015	0,0016
Ansatz 3	6,0	0,00136	0,00112	0,0017
Ansatz 4	6,5	0,00112	0,00088	0,0012

0,2 g Knochen enthielten, vollkommen in HCl aufgelöst, 0,0472 g Ca.

Wie schon diese nur mit Kalkbestimmung durchgeführten Versuche 1 und 2 zeigen, erfolgt die Auflösung der Knochenkalkverbindung in biologisch noch in Betracht kommenden Säuregraden nur sehr langsam; bei der besonders geringen Auflösung im Phosphatpuffer (Versuch 2) spielt naturgemäß auch die Reaktionshemmung durch das vorgelegte Reaktionsprodukt (Phosphorsäure) (s. dazu auch Versuch 3) eine Rolle. Immerhin ist der Einfluß der P h in der zu erwartenden Weise (Förderung der Auflösung durch Aciditätszunahme) auch noch innerhalb physiologischer Bereiche ersichtlich.

3. Ansatz
1. 0,2 g Knochen + 20 ccm $^1/_3$ mol. prim. Phosphat
2. 0,2 g Knochen + 20 ccm $^1/_{30}$ mol. prim. Phosphot.
3. 0,2 g Knochen + 20 ccm n/10 Natr.-acetat + Essigsäure 1 : 1
4. 0,2 g Knochen + 20 ccm n/10 Natr.-acetat + Essigsäure 1 : $^1/_{16}$

Nach 24 Stunden wird in der Lösung Ca und P bestimmt.

Tabelle 3.

	P_h	Ca g in 20 ccm	P g in 20 ccm	ungefähres mol. Verhältn. Ca / P
Ansatz 1	5,0	0,00272	—	—
Ansatz 2	5,5	0,00136	—	—
Ansatz 3	4,5—5	0,01728	0,01032	1 : 0,7
Ansatz 4	6 5	0,00216	0,000669	1 : 0,5

Wie die entscheidenden Versuche mit Acetatpuffer erkennen lassen, geht bei P_h 6,5 auf dieselbe Menge Ca weniger P in Lösung als bei P_h 4,5—5.

Es ist das nur so zu erklären, daß bei weniger saurer Reaktion relativ mehr Calciumcarbonat abgegeben wird.

II. Versuch über den Einfluß der P_h auf das Niederschlagsverhältnis von Ca, P und CO_2.

Zwei gleiche Ansätze mit 900 ccm Na HCO_3 m/100
90 ccm $CaCl_2$ m/25
90 ccm prim. Phosphat m/25

Der erste Ansatz mit 80 ccm n/10 NaOH.

und der zweite Ansatz mit 12,5 ccm $n/_{10}$ NaOH.

Beide wurde 24 Stunden lang stehen gelassen und dann Calcium und P und CO_3 in dem Niederschlag bestimmt. Das Ergebnis ist in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 4.

	P_h	Ca in mg	P in mg	CO_2 in mg	ungefähres mol-Verhältnis v. Ca : P : CO_2
Ansatz 1	Ca 7.0	99,64	36,76	25,0	2,5 : 1,2 : 0,55
Ansatz 2	Ca 8.0	72,24	31,12	4,75	1,8 : 1 : 0,1

Der Versuch ergibt somit folgendes:

1. Wie zu erwarten war, ist die Gesamtmenge des Niederschlags bei stärkerer alkalischer Reaktion vermehrt.

2. Das Verhältnis von Ca : P : CO_2 entspricht im Groben dem der natürlichen Knochenkalkzusammensetzung.

3. Auf das feinere Verhältnis erweist sich die Reaktion von entscheidender Bedeutung. Wie schon aus den Auflösungsversuchen angenommen werden konnte, erweist sich das Calciumcarbonat bei einer P_h-Verschiebung nach der sauren Seite, als wesentlich löslicher wie das Calciumphosphat.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Aus dem zuletzt mitgeteilten Versuchsergebnis läßt sich meines Erachtens folgendes entnehmen:

Aus Lösungen von Calciumchlorid, Phosphat und Bicarbonat im ungefähren Verhältnis der Blutzusammensetzung fällt ein Niederschlag aus,

in welchem das Verhältnis der drei Jonen Ca, PO_4, CO_3 weitgehend mit dem im Knochenmineral vorhandenen übereinstimmt. Dieses Verhältnis ist deutlich von der Reaktion abhängig: Mit Aciditätszunahme nimmt der Kohlensäuregehalt des Niederschlages nicht nur absolut, sondern auch relativ zur ausgefallenen Phosphorsäure ab; auch der Calciumgehalt nimmt relativ stärker ab als das Phosphat, die Calciumdifferenz entspricht etwa der der Kohlensäure.

In der umgekehrten Richtung ist nach diesem Ergebnis zu erwarten, daß bei Demineralisation des Knochens durch Säuerung das Knochenmineral zunächst partiell d. h. hinsichtlich seines Calciumcarbonatgehaltes aufgelöst wird. Das Calciumcarbonat würde demnach ein besonders leicht zu mobilisierendes Calciumdepot darstellen.

Die Uebereinstimmung der Reagenzglasversuche mit etwaigen physiologischen Erfahrungen würden natürlich keineswegs beweisen, daß die Bildung des Knochenminerals durch einen rein chemischen nicht „lebendigen" Vorgang zustande kommt. Aber auch bei Mitwirkung von Lebensvorgängen ist zu erwarten, daß die Mineralisation den Gesetzen der Chemie gehorcht. Das lebendige Geschehen könnte dabei etwa dadurch entscheidend in die „leblosen" Prozesse eingreifen, daß durch bestimmte Lebensvorgänge die das Gleichgewicht der Mineralien beherrschende Reaktionslage geregelt und den physiologischen Bedürfnissen angepaßt wird.

Literatur

1. Pfaundler: Jahrbuch der Kinderheilkunde Bd. 60, 1904.
2. Freudenberg und György: Biochem. Zeitschr. Bd. 110, 115, 118, 121, 1924, 129.

   György: Jahrbuch der Kinderheilkunde, Bd. 102, 1923.
3. Shear und Kramer J.: of biol. chem. 79, 125 und 147 (1928).
4. Hoppe—Seyler: Phys. Chemie, Berlin 1881.
5. Werner, A.: Ber. d. D. Chem. Ges., Bd. 40 S. 4441, 1907.
6. Klement: Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 184 S. 132, 1929.
   — Klin. Woschr. 1937 S. 591.
7. Klement und Trömel: Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 196 S. 140.
   — Klin. Woschr. 1933 S. 292.

Lebenslauf

Am 14. März 1911 wurde ich in Hard (Vorarlberg) als Sohn des Chemikers Karl Bauer geboren. In meinem 2. Lebensjahr verzogen meine Eltern nach Dresden, und ich besuchte dort folgende Schulen: 1917—1921 die Volksschule und 1921—1930 das humanistische Gymnasium in Dresden-Neustadt. Nach Ablegung der Reifeprüfung im Jahre 1930 studierte ich Medizin, SS. 1930 bis WS. 1932/33 in Tübingen, SS. 1933 in Königsberg und WS. 1933/34 bis SS. 1935 wieder in Tübingen. Im Februar 1936 bestand ich das medizinische Staatsexamen mit „gut". Vom April bis Juni war ich am pharmakologischen Institut als Medizinalpraktikant tätig, wo ich mich hauptsächlich mit meiner Doktorarbeit „über die Löslichkeit des Knochenkalks" beschäftigte. Seit Juni 1936 bin ich am Kreiskrankenhaus Geislingen/St. auf der inneren Abteilung als Medizinalpraktikant.

Hans Bauer